

INTOXICACION POR HERBICIDA Y EL USO DE LA TIAMINA. UN ESTUDIO EXPERIMENTAL.

(*)Pérez-Pérez Elizabeth; Calderón de Cabrera Lourdes; Rodríguez-Malaver Antonio J;

Dmitrieva Natalia. Correo Electrónico: elimariana@ula.ve

(*)Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, *Departamento de Farmacología y Toxicología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela.

RESUMEN

El envenenamiento con pesticidas, accidental o intencional, es un problema de gran interés en países en desarrollo. El Paraquat es un compuesto ampliamente utilizado como un herbicida de contacto no selectivo desde 1962. La ingestión de paraquat es un método significativo de suicidio en algunas partes de Asia, las islas del Pacífico y el Caribe. El paraquat es altamente tóxico, y la ingestión de grandes cantidades resulta en la muerte por falla de múltiples órganos; sin embargo, en pequeñas cantidades se acumula en el pulmón, en donde el ciclo redox y la generación de radicales libres desencadenan una respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y finalmente, un proceso fibrótico irreversible, que termina con la muerte del paciente en algunas semanas. En este trabajo se investigó la capacidad de la tiamina de proteger contra la mortalidad y el daño oxidativo inducido por el paraquat (PQ) en hígado de ratas. La dosis media letal (LD_{50}) para el PQ fue de 32 mg/kg de peso corporal al cabo de 48 h. Cuando fue administrada la tiamina (100 mg/kg) no se observó mortalidad inducida por PQ. Sin embargo, la tiamina en dosis de 200 mg/kg no modificó los patrones de mortalidad. En el estudio de estrés oxidativo se obtuvo el hígado de cada rata después de 24 h del tratamiento con PQ y fueron determinadas las sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS). Estos estudios permitieron determinar que el PQ indujo un incremento significativo en los niveles de TBARS y la tiamina previno este incremento.

Palabras clave: antioxidante, paraquat, estrés oxidativo, tiamina.

ABSTRACT

Pesticide poisoning, accidental or intentional self-poisoning is a significant problem in many parts of the developing world. Paraquat is a compound that has been widely used as a non-selective contact herbicide since 1962. Ingestion of paraquat is a significant method of self-poisoning in parts of Asia, Pacific islands, and Caribbean. Ingestion of large amounts is considered to be uniformly fatal, resulting in death from multi-organ; however, in smaller quantities, paraquat is specifically taken up into and accumulates in the lung, and the redox cycling and free radical generation triggers a neutrophil-mediated inflammatory response in the lungs which initiates an irreversible fibrotic process that kills the majority of patients within several weeks. In this work, was studied the ability of thiamine to protect against Paraquat (PQ)-induced mortality and oxidative damage in rat liver. The medial lethal dose (LD_{50}) for PQ was 32 mg/kg of body weight within 48 h. When thiamine (100 mg/kg) was administrated to PQ-treated rats, mortality was not observed. However, thiamine at 200 mg/kg did not modify mortality. For the oxidative stress study, the liver was obtained 24

h after PQ-treatment and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured. PQ induced a significant increase in TBARS levels and thiamine prevented this increase.

Key words: antioxidant, oxidative stress, paraquat, thiamine.

INTRODUCCIÓN

El Paraquat (PQ, Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) es un herbicida catiónico, no selectivo, de los más ampliamente utilizados para eliminar las malezas de hoja ancha (Qiao-Ming *et al.*, 2011). Bajo condiciones normales de manufactura y uso, se ha demostrado que el PQ puede ser bastante seguro. Sin embargo, el contacto intencional y/o accidental con la piel o la ingestión de formulaciones líquidas de PQ han causado un gran número de decesos humanos. Los órganos afectados incluyen hígado, riñón, estómago, corazón, y timo; pero es el pulmón el órgano primario afectado por la toxicidad del PQ, donde el mismo es acumulado a través de los procesos de transporte activo de poliamina en las células epiteliales alveolares tipo I y II, causando en el peor de los casos una fibrosis pulmonar masiva (van der Wal *et al.*, 1990; Hemmati *et al.*, 2002). Se han reportado casos de severo daño pulmonar inducido por el PQ tanto en animales (Clark *et al.*, 1996) como en humanos (Lee *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008). Recientemente, se ha demostrado que factores ambientales, en especial los pesticidas, representan uno de los agentes neurotóxicos primarios asociados con la enfermedad de Parkinson, y varios estudios epidemiológicos identificaron la exposición a PQ como un factor de riesgo potencial para el desarrollo de esta enfermedad (Singh *et al.*, 2012).

Aunque el mecanismo definitivo y detallado de la toxicidad de PQ aun no ha sido completamente explicado, se

ha demostrado que la toxicidad por PQ involucra la generación de un considerable número de radicales libres del oxígeno que interactúan con los lípidos de la membrana, conllevando a la muerte celular (Suntres, 2002). Por ende, el PQ ocasiona daño celular agudo al someter a las células a ciclos redox, por lo que se cree que el estrés oxidativo es el mecanismo crucial utilizado por este compuesto. Además, en relación con el daño al pulmón inducido por el PQ, se ha demostrado que las células inflamatorias asociadas con la alveolitis (macrófagos, linfocitos, neutrófilos, etc.) pueden producir abundante citokinas inflamatorias o factores de crecimiento, tales como TNF- α , MCP-1, TGF- β 1, MMP-2 and TIMP-1, que pueden jugar un papel fundamental en el daño epitelial y la fibrosis pulmonar (Ishida *et al.*, 2006; Satomi *et al.*, 2006).

La terapia para tratar el envenenamiento con PQ, sin obtener resultados óptimos en cuanto a la sobrevivencia, se ha concentrado en reducir la absorción por parte de tracto gastrointestinal, a través de bentonita, carbón activado, o la tierra de Fuller; o incrementando su eliminación, por medio de la diuresis forzada, la hemodiálisis o hemofiltración estándar (Lock y Wilks, 2001). Por ejemplo, Koo *et al.* (2002), encontraron que es uso de hemofiltración continua junto con hemoperfusión se reduce la porción de los pacientes que fallecen por fallas en múltiples órganos, mientras que se incrementa la proporción de fallecimientos debidos a problemas respiratorios. Por ende, hasta la fecha no se ha desarrollado tratamientos para el envenenamiento con PQ que sean clínicamente eficaces, y como consecuencia, las tasas de mortalidad siguen siendo altas (Goel y Aggarwal,

2007), siendo necesario el desarrollo de las mismas.

Debido a que el principal mecanismo de la intoxicación por PQ es la generación de radicales libres producidos por la peroxidación, se han ensayado clínicamente un gran número de antioxidantes que podrían interferir con este proceso (Lock y Wilks, 2001; Suntres, 2002). Desafortunadamente, ninguno de los tratamientos ensayados, incluyendo hipoxia controlada, superóxido dismutasa, vitamina C y E, N-acetilcisteína, y óxido nítrico, han probado no ser completamente efectivos (Suntres, 2002; Meulenbelt y Vale, 2009). Además, se han encontrado efectos protectores de la muerte celular *in vitro* e *in vivo* de una serie de compuestos tales como el factor neurotrófico de células gliales (GDNF) (Ortiz-Ortiz *et al.*, 2011), ambroxol (Zhi *et al.*, 2011), y el inhibidor de la quinona oxidoreductasa 2 (QR2) (Janda *et al.*, 2012).

Por otra parte, la tiamina (Vitamina B1) es un nutriente esencial para los mamíferos, lo obtienen principalmente de la dieta, y lo convierten en tiamina difosfato (THI-PP), usando la tiamina difosfoquinasa (TPK) (Mehta *et al.*, 2008). Además del muy bien conocido papel de la tiamina en la nutrición humana y como cofactor de enzimas, estudios recientes sugieren que la tiamina podría aliviar el estrés en diferentes organismos. En microsomas de hígados de ratas, la tiamina inhibió la peroxidación lipídica y la oxidación por radicales libres del ácido oleico *in vitro* (Lukienko *et al.*, 2000). Adicionalmente, se disminuyó el estrés oxidativo en células de hígado cuando las mismas fueron suplementadas con una combinación de tiamina y ascorbato (Wang *et al.*, 2007). Sheline and Choi (2004) reportaron que la tiamina es un potencial agente terapéutico para la enfermedad de Wilson, debido a la restauración de la actividad enzimática dependiente de tiamina, la cual es inhibida por las especies

reactivas del oxígeno inducidas por Cu^{2+} . Mientras que los estudios *in vitro* sugieren que la tiamina puede actuar directamente como un antioxidante, la asociación entre las enzimas dependientes de tiamina y el estrés oxidativo puede indicar un papel vital para la tiamina en condiciones de estrés.

Por todo lo mencionado anteriormente, el objetivo de esta investigación fue examinar los efectos de la tiamina en la mortalidad y el estrés oxidativo inducido por PQ en ratas.

METODOLOGÍA

1. Químicos. PQ (Gramoxone®, 33% de pureza) fue comprado a la empresa Imperial Medical Industrial (UK) y fue diluido con agua destilada a una concentración de 16 mg/ml. La tiamina en su forma cloruro de tiamina (Neridal®) fue obtenida de Laboratorios Vargas (Venezuela). Fue utilizada para todas las preparaciones agua Milli-QR (Millipore, Bedford, MA). Los reactivos Ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA) y 1,1,3,3-tetramethoxy propano fueron de la empresa Sigma (St. Louis, MO).

2. Animales. Las ratas fueron manejadas de acuerdo a las regulaciones internacionales, y mantenidas bajo condiciones regulares de humedad, comida, ciclos circadianos y temperatura. Fueron usadas ratas Sprague-Dawley (peso corporal: 270-300 g) mantenidas a temperatura ambiente, con ciclos de 12 h de luz-oscuridad. Las ratas recibieron alimento estándar de laboratorio y agua *ad lib*.

3. Estudio de la LD_{50} . Para evaluar el efecto de la tiamina en la mortalidad inducida por PQ fueron usadas 120 ratas. Después de la aclimatación, los animales fueron divididos en tres grupos de cuarenta (40) animales cada uno. Cada grupo fue dividido al azar en 4 sub-grupos de 10 individuos. El primer grupo recibió las

siguientes dosis de PQ 10, 20, 30 o 40 mg/kg, administrado de manera oral. El segundo grupo fue tratado con PQ y también recibió 100 mg/kg de tiamina dos veces al día (a las 8:00 a.m. y a las 4:00 p.m.) por medio de administración oral. El tercer grupo fue tratado con PQ y con 200 mg/kg de tiamina de manera similar que el segundo grupo. Se contó el número de animales que sobrevivieron después de 48 h de la administración del PQ.

4. Estudio sobre el estrés oxidativo.

Después de la aclimatación, 60 ratas Sprague-Dawley fueron divididas al azar en 6 grupos de 10 individuos cada uno: grupo control, grupo tratado con PQ, grupo tratado con PQ + tiamina (100 mg/kg), grupo tratado con PQ + tiamina (200 mg/kg), grupo tratado con tiamina (100 mg/kg) y grupo tratado con tiamina (200 mg/kg). El PQ fue administrado en una única dosis de 32 mg/kg. Todos los animales fueron sacrificados por decapitación después de 24 h de la administración del PQ, escogiéndose este periodo debido a que los decesos ocurridos después de este periodo se deben a disfunción primaria de órganos y no está directamente correlacionada con la generación de radicales libres (Melchiorri *et al.*, 1996). Después de la decapitación, fue extraído el hígado de cada rata y preparado según lo reportado por Ambrosio *et al.* (1991), preparados a una concentración de 3,3% (m/v) en buffer fosfato 50 mM (pH 7,4). Fueron determinadas las sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS, del inglés thiobarbituric acid reactive substances) como lo describió Wilson *et al.* (1997), usando 1,1,3,3-tetramethoxy propano como estándar. Para ello se colocaron 0,5 ml del homogenato de hígado, 1 ml de TBA en 0,25 mol/L de HCl, y 3 ml de ácido tricloroacético al 15 (v/v); la mezcla se calentó por 30 min en baño de maría, y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se leyó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm.

Las proteínas fueron determinadas usando el procedimiento de Lowry *et al.* (1951) usando albúmina bovina como estándar.

5. Análisis estadístico. Los datos de los estudios de mortalidad fueron analizados de acuerdo a Tallarida y Murray (1994). Los datos de la peroxidación lipídica fueron analizados por medio del procedimiento de análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por el test de comparación múltiple Newman-Keuls (GraphPad, Prism®, Versión 2.01). El nivel de significancia aceptado fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Estudio de la LD₅₀

La mortalidad inducida por el PQ y la posible protección conferida por diferentes dosis de tiamina fueron determinadas 48 h después de la administración oral del herbicida. El LD₅₀ para el PQ fue de 31,73 mg/kg de peso corporal. No se registró mortalidad en el grupo de PQ + tiamina (a 100 mg/kg) en el rango de concentraciones de PQ utilizadas en este estudio. Por el contrario, la LD₅₀ para el grupo de PQ más tiamina a 200 mg/kg fue de 28 mg/kg. Esta LD₅₀ no fue estadísticamente diferente de la LD₅₀ del grupo al que se le administró solamente PQ (Figura 2).

2. Estudio de estrés oxidativo

En el hígado, el PQ incrementó significativamente la peroxidación lipídica después de 24 h de su administración en niveles de 70% mayores a aquellos encontrados en los animales del grupo control (Tabla 1). Cuando los animales fueron tratados con tiamina (a 100 mg/kg o 200 mg/kg), se previno el incremento de niveles de TBARS inducido por el PQ y el nivel de peroxidación lipídica se asemejó a los valores del grupo control (Tabla 1). Adicionalmente, la tiamina redujo ligeramente la peroxidación lipídica en el

hígado, de una manera estadísticamente diferente a la reportada por el grupo control (Tabla 1).

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que, dependiendo de la dosis, la tiamina puede conferir protección contra la mortalidad inducida por el PQ (aplicada a 100 mg/kg) o no tener ningún efecto en la toxicidad inducida por PQ (aplicada a 200 mg/kg).

La ausencia de mortalidad observada en las ratas tratadas con tiamina (100 mg/kg) puede deberse a la actividad antioxidante de esta vitamina. Debido a que la intoxicación con PQ ha sido asociada a la generación de radicales libres y a la estimulación de la peroxidación lipídica, se decidió estudiar los niveles de TBARS en el hígado de ratas después de la administración de PQ y el co-tratamiento con tiamina. En este estudio, los mayores niveles de TBARS fueron detectados después de la administración del PQ. Esta observación es consistente con ciertos reportes en los que se observan incrementos en la peroxidación lipídica causada por este herbicida (Meulenbelt y Vale, 2009). Por otra parte, la tiamina fue capaz de reducir los niveles de peroxidación lipídica en el hígado de ratas tratadas con PQ. Resultados similares fueron reportados por Jung y Kim (2003), quienes investigaron la reducción de la inhibición del crecimiento celular y la represión de la expresión de los genes *soxS*, *sodA*, *zwf* y *soi19::lacZ*, relacionados con el estrés oxidativo en *Escherichia coli* por parte de la tiamina, una vez que fueron generados radicales libres con PQ. Los autores encontraron que cuando la tiamina se agregaba en concentraciones superiores a 1 μM se restauraba la tasa de crecimiento, la cual había sido disminuida con el tratamiento con PQ. Además, el PQ (1 μM) incrementaba la expresión de los genes *soxS*,

sodA y *zwf*, involucrados con la activación de superóxido dismutasa dependiente de manganeso y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, para contrarrestar el estrés oxidativo. Sin embargo, la inducción de estos genes fue suprimida por el suplemento de tiamina. Por último, demostraron que la tiamina puede parcialmente secuestrar el anión superóxido y el radical hidroxilo, y de este modo, afectar la respuesta celular al estrés oxidativo inducido por estas especies reactivas de oxígeno.

La actividad antioxidante de la tiamina puede ser explicada de acuerdo a: i) la tiamina puede actuar como un antioxidante indirecto, promoviendo la producción de equivalentes reductores (NADPH, a través de la ruta de las pentosas fosfato), o funcionando como un agente quelante de los metales de transición tales como hierro y cobre; y/o ii) actuando como un antioxidante de sacrificio. En relación con la actividad antioxidante indirecta de la tiamina, se ha sugerido que el NADPH es oxidado por radicales libres de oxígeno generados en el reciclaje redox del PQ y la disminución resultante de NADPH contribuye con la reducción de la formación de glutatona, un importante antioxidante de las células (Ishida *et al.*, 2006). Además, Iannone *et al.*, 2011 han reportado que la disminución de los niveles de NADPH es uno de los últimos eventos en el daño pulmonar de ratas envenenadas con PQ. Estos autores también han propuesto que la tiamina puede prevenir la disminución de los niveles de NADPH, manteniendo niveles óptimos de glutatona reducida para la protección de la célula contra la intoxicación por PQ. Existe evidencia de que la tiamina puede actuar como un antioxidante preventivo, quelando iones metálicos que pueden ser liberados de los almacenamientos celulares después de la intoxicación con PQ (Fisher *et al.*, 1998). Se han realizado muchas especulaciones acerca de la actividad de antioxidante de sacrificio de la tiamina y se necesita de

mucho más estudio, aunque la presencia de un átomo de S en la estructura química de la tiamina podría representar un sitio de interacción con radicales libres (Huang *et al.*, 2010).

El tratamiento del envenenamiento por PQ en humanos usualmente consiste en medidas tales como inducir el vómito, lavado gástrico, adsorción del herbicida en bentonita, hemodiálisis, diálisis peritoneal, administración de esteroides, y terapia inmunosupresora (Serra *et al.*, 2003). Sin embargo, estos tratamientos son generalmente inefectivos, permitiendo que la mortalidad se encuentre entre 33-50%. Por esta razón, es de gran importancia encontrar nuevos tratamientos para el envenenamiento con PQ en humanos. Una posibilidad consiste en usar antioxidantes. Enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, y MnTBAP, una metaloporfirina de bajo peso molecular similar al SOD, han demostrado reducir los niveles de daño en el pulmón inducidos por el PQ (Serra *et al.*, 2003). También se ha reportado que compuestos antioxidantes de bajo peso molecular tales como el *N*-acetil-cisteína (NAC) (Chyka *et al.*, 2000), vitamina E (Bando *et al.*, 2007) y melatonina (Shang *et al.*, 2009) pueden ser efectivos en disminuir el daño pulmonar inducido por el PQ.

Aunque no es posible extrapolar los resultados obtenidos en modelos de laboratorio a seres humanos, este estudio presenta a la tiamina como un nuevo medio posible para el tratamiento del envenenamiento por PQ, para la cual es necesario investigar la efectividad en humanos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Andrés Márquez por su dedicada asistencia técnica y al Dr. Luis E. González por sus

invalorable comentarios. Este trabajo fue financiado por el CDCHT-ULA (Proyecto No. M-624-98-03-E).

REFERENCIAS

1. Ambrosio, G., Flaherty, J.T., Duilio, C., Tritto, I., Santoro, G., Elia, P.P., Condorelli, M., Chiariello, M. 1991. Oxygen radicals generated at reflow induce peroxidation of membrane lipids in reperfused hearts. *J Clin Invest* 87:2056-2066.
2. Bando, N., Wakamatsu, S., Terao, J. 2007. Effect of an excessive intake of quercetin on the vitamin E level and antioxidative enzyme activities of mouse liver under paraquat-induced oxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(10):2569-2572.
3. Chyka, P.A., Butler, A.Y., Holliman, B.J., Herman, M.I. 2000. Utility of acetylcysteine in treating poisonings and adverse drug reactions. *Drug Saf* 2:123-148.
4. Clark, D.G., McElligott, T.F., Hurst, E.W. 1996. The toxicity of paraquat. *Brit J Ind Med* 23:126-132.
5. Fischer, A.B., Hess, C., Neubauer, T., Eikmann, T. 1998. Testing of chelating agents and vitamins against lead toxicity using mammalian cell cultures. *Analyst* 183:55-58.
6. Goel, A., Aggarwal, P. 2007. Pesticide poisoning. *Natl Med J India* 20(4):182-191.
7. Hemmati, A.A., Nazari, Z., Motlagh, M.E., Goldasteh, S. 2002. The role of sodium cromolyn in treatment of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rat. *Pharmacol Res* 46: 229-234.
8. Huang, H.M., Chen, H.L., Gibson, G.E. 2010. Thiamine and oxidants interact to modify cellular calcium stores.

Neurochem Res 35(12):2107-2116.

9. Iannone, M.F., Rosales, E.P., Groppa, M.D., Benavides, M.P. 2011. Reactive Oxygen Species Formation and Cell Death in Catalase-Deficient Tobacco Leaf Discs Exposed to Paraquat. *Biol Trace Elem Res* 23:123-134.

10. Ishida, Y., Takayasu, T., Kimura, A. 2006. Gene expression of cytokines and growth factors in the lungs after paraquat administration in mice. *Leg Med* 8:102-109.

11. Janda, E., Aprigliano, S., Visalli, V., Sacco, I., Ventrice, D., Politi, G., Mega, T., Vadalá, N., Rinaldi, S., Musolino, V., Palma, E., Gratteri, S., Rotiroti, D., Mollace, V. 2012. The antidote effect of Quinone Oxidoreductase 2 (QR2) inhibitor on paraquat-induced toxicity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01870.x

12. Jung, I.L., Kim, I.G. 2003. Thiamin protects against paraquat-induced damage: scavenging activity of reactive oxygen species. *Environ Toxicol Pharmacol* 15:19-26.

13. Koo, J.R., Kim, J.C., Yoon, J.W., Kim, G.H., Jeon, R.W., Kim, H.K., Chae, D.W., Noh, J.W. 2002. Failure of continuous venovenous hemofiltration to prevent death in paraquat poisoning. *Am J Kidney Diseases* 39:55-59.

14. Lee, H.L., Lin, H.J., Yeh, S.Y., Chi, C.H., Guo, H.R. 2008. Etiology and outcome of patients presenting for poisoning to the emergency department in Taiwan: a prospective study. *Hum Exp Toxicol* 27(5):373-379.

15. Lock, E.A., Wilks, M.F. 2001. Handbook of pesticide toxicology. 2 edn. San Diego: Academic Press; Paraquat.

16. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein

measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

17. Lukienko, P.I., Mel'nichenko, N.G., Zverinskii, I.V., Zabrodskaya, S.V. 2000. Antioxidant properties of thiamin. *Bull Exp Biol Med* 130:874-876.

18. Mehta, R., Shangari, N., O'Brien, P.J. 2008. Preventing cell death induced by carbonyl stress, oxidative stress or mitochondrial toxins with vitamin B anti-AGE agents. *Mol Nutr Food Res* 52:379-385.

19. Melchiorri, D., Reiter, R.J., Attia, A.M., Hara, M., Burgos, A., Nisticò, G. 1994. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci* 56:83-89.

20. Meulenbelt, J., Vale, A. 2009. Serum total antioxidant statuses of survivors and nonsurvivors after acute paraquat poisoning. *Clin Toxicol* 47(3):257-263.

21. Ortiz-Ortiz, M.A., Morán, J.M., Ruiz-Mesa, L.M., Bonmatty, R.G., Fuentes, J.M. 2011. Protective effect of the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on human mesencephalic neuron-derived cells against neurotoxicity induced by paraquat. *Environ Toxicol Pharmacol* 31(1):129-136.

22. Qiao-Ming, Z., Li-tao, Y., Hai-chen, S. 2011. Protective Effect of Ambroxol against Paraquat-induced Pulmonary Fibrosis in Rats. *Intern Med* 50:1879-1887.

23. Satomi, Y., Tsuchiya, W., Miura, D., Kasahara, Y., Akahori, F. 2006. DNA microarray analysis of pulmonary fibrosis three months after exposure to paraquat in rats. *J Toxicol Sci* 31:345-355.

24. Serra, A., Domingos, F., Prata, M.M. 2003. Paraquat intoxication. *Acta Med Port* 16(1):25-32.

25. Shang, Y., Xu, S.P., Wu, Y.,

Jiang, Y.X., Wu, Z.Y., Yuan, S.Y., Yao, S.L. 2009. Melatonin reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Chin Med J* 122(12):1388-1393.

26. Sheline, C.T., Choi, D.W. 2004. Cu^{2+} toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. *Ann Neurol* 55:645-653.

27. Singh, M., Murthy, V., Ramassamy, C. 2012. Standardized extracts of *Bacopa monniera* protect against MPP⁺- and paraquat-induced toxicity by modulating mitochondrial activities, proteasomal functions, and redox pathways. *Toxicol Sci* 125(1):219-32.

28. Suntres, Z.E. 2002. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 180:65-77.

29. Tallarida, R.J., Murray, R.B. 1994. Manual of Pharmacological Calculations with Computer Programs. Springer, Berlin.

30. Tang, W.J., Sun, H.C., Xu, B.H. 2008. Emergency treatment of acute paraquat intoxication. *J Med Postgrad* 21:394-397.

31. van der Wal, N.A., van Oirschot, J.F., van Dijk, A. 1990. Mechanism of protection of alveolar type II cells against paraquat-induced cytotoxicity

by deferoxamine. *Biochem Pharmacol* 39:1665-1671.

32. Wang, C., Liang, J., Zhang, C., Bi, Y., Shi, X., Shi, Q. 2007. Effect of ascorbic acid and thiamin supplementation at different concentrations on lead toxicity in liver. *Ann Occup Hyg* 51:563-569.

33. Wilson, D.W., Metz, H.N., Graver, L.M., Rao, R.S. 1997. Direct method for quantification of free malondialdehyde with high-performance capillary electrophoresis in biological samples. *Clin Chem* 43:1982-1984.

34. Zhi, Q.M., Yang, L.T., Sun, H.C. 2011. Protective effect of ambroxol against paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. *Intern Med* 50(18):1879-1887.

Abreviaciones usadas: ANOVA, análisis de varianza; LD₅₀, dosis letal 50; MDA, malondialdehído; NAC, N-acetil-cisteína; PQ, Paraquat; SE, error estándar; SOD, superóxido dismutasa; TBARS, especies reactivas del ácido tiobarbitúrico.

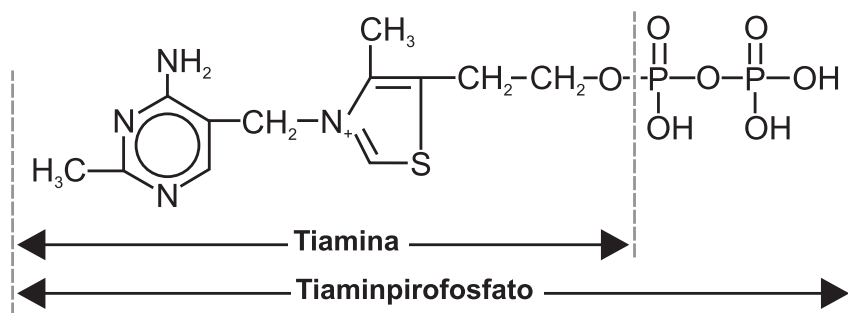


Figura 1. Estructura química de la tiamina (vitamina B1).

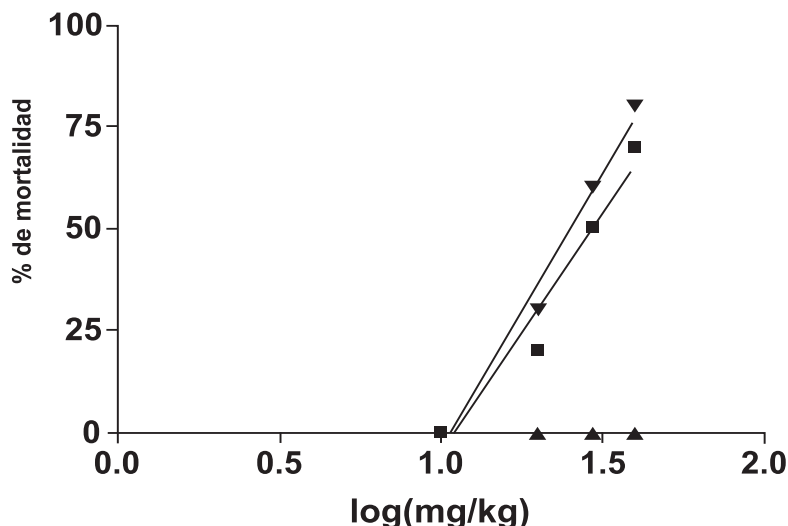


Figura 2. Efecto de la tiamina (100 y 200 mg/kg de peso corporal) en la mortalidad inducida por PQ (10-40 mg/kg). n = 10. Clave: (■) paraquat; (▲) paraquat + tiamina (100 mg/kg); y (▼) paraquat + tiamina (200 mg/kg). Los datos fueron analizados de acuerdo a Tallarida y Murray [27]. Paraquat LD₅₀: 32 mg/kg de peso corporal; paraquat + tiamina (200 mg/kg) LD₅₀: 28 mg/kg de peso corporal.

Tabla1. Efecto de la tiamina (100 y 200 mg/kg) en la peroxidación lipídica inducida por paraquat (32 mg/kg) en hígado de rata.

Tratamiento	TBARS (nmol de MDA /mg de proteína)
Control	3.12±0.24 (n=6)
PQ (32 mg/kg)	5.27±1.13* (n=6)
PQ + tiamina (100 mg/kg)	2.84±0.37** (n=9)
PQ + tiamina (200 mg/kg)	3.40±0.61** (n=7)
Tiamina (100 mg/kg)	2.55±0.41* (n=8)
Tiamina (200 mg/kg)	2.61±0.31* (n=8)

Nota. La peroxidación lipídica fue determinada como se describió en materiales y métodos y se representó por los niveles de TBARS. Los valores se presentan como media ± DS, n=número de animales.

*Significativamente diferente del control, $p < 0.05$ (ANOVA de una sola vía, seguido del test de Newman-Keuls).

** Significativamente diferente del grupo tratado con PQ, $p < 0.05$ (ANOVA de una sola vía, seguido del test de Newman-Keuls).